Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie
an der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. P. Naumann)

UNTERSUCHUNGEN ZUR TOXIZITÄTSPRÜFUNG VON DENTALAMALGAMEN IN MENSCHLICHEN EMBRYONALEN FIBROBLASTEN

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Hugo Zemke

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0073

Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie
an der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. P. Naumann)

UNTERSUCHUNGEN ZUR TOXIZITÄTSPRÜFUNG VON DENTALAMALGAMEN IN MENSCHLICHEN EMBRYONALEN FIBROBLASTEN

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Hugo Zemke

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.:
Prof. Dr. M. Straßburg

Referent
gez.:
Prof. Dr. W.A.K. Schmidt

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. F. Schübel

Meiner Frau gewidmet

INHALT

1.	EINLEITUNG	1
2.	THEMATIK	3
3.	MATERIAL UND METHODEN	4
3.1.	Matrize zur Herstellung der Prüfkörper	4
3.2.	Herstellung der Prüfkörper	6
3.2.1.	Amalgamprüfkörper	6
3.2.2.	Bezugssystem	8
3.2.3.	Prüfkörper aus anderen Metallen	9
3.3.	Herstellung des Methylzellulose Overlays	9
3.4.	Herstellung der Methylenblau-Lösung	10
3.5.	Zellkulturen und Zellvermehrung	10
3.6.	Untersuchung der Prüfkörper auf Toxizität in der Zellkultur	10
4.	AUSWERTUNG VON VERSUCHSERGEBNISSEN	14
5.	VERSUCHSERGEBNISSE	18
5.1.	1.Versuchsreihe	19
5.2.	2.Versuchsreihe	22
5.3.	3.Versuchsreihe	37
5.4.	4.Versuchsreihe	46
6.	DISKUSSION	48
7.	ZUSAMMENFASSUNG	54
8.	LITERATURVERZEICHNIS	55

1. EINLEITUNG

Der Medizin bieten sich ständig neue Werkstoffe,die von ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften her zunächst geeignet erscheinen, als Ersatz für organische Substanz in den lebenden Organismus inkorporiert zu werden. Die Anwendung derartiger Materialien wird jedoch durch die unterschiedlichen Reaktionen der angrenzenden Gewebe und des Gesamtorganismus zumeist eingeschränkt oder gar untersagt. Auslösend für diese Reaktion können unter anderem sein: lokale oder allgemeine Toxizität, tumorgenetische und allergisierende Eigenschaften, Applikationsart und -dauer, Größe des Implantats, Oberflächenbeschaffenheit, mechanische Verankerung und Belastung sowie der zusätzliche temporäre Einfluß weiterer exogener Stoffe, wie z.B. in der Mundhöhle bei der Aufnahme von Speisen.

Es ist daher notwendig, vor der definitiven, spezifischen Applikation eine umfangreiche biologische Prüfung dieser artfremden Materialien durchzuführen, um die Toleranzbreite des Organismus zu kennen.

Besonders groß ist die Zahl der in der Zahnmedizin verwendeten Werkstoffe, die zeitweilig oder dauernd in der Mundhöhle mit der Mundschleimhaut, der Zahnhartsubstanz oder wie z.B. bei Implantaten mit dem Knochen in Berührung kommen. Während für die Prüfung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der zahnärztlichen Werkstoffe bereits seit langem Testmethoden festgelegt sind (z.B. ADA, FDI, ISO)*, gibt es trotz vieler Untersuchungen zur biologischen Werkstoffprüfung noch keine genormten Versuchsbestimmungen.

*ADA = American Dental Association
FDI = Féderation Dentaire Internationale
ISO = International Standardization Organisation

Nach Klötzer (9) sollte die biologische Materialprüfung in drei aufeinander folgenden Teststufen erfolgen:

1. Toxizitäts- und Eliminationstests
2. Anwendungstests
3. Klinische Erprobung

Der Test in der Zellkultur ist der ersten Gruppe zugeordnet und wird als empfindliche Methode angesehen. Durch vorausgehende in vitro Versuche können bereits Vorentscheidungen getroffen und unnötige Tierversuche erspart werden. Spangberg (20) beobachtete bei vergleichenden in vitro und in vivo Versuchen mit zahnärztlichen Werkstoffen (Wurzelfüllmaterialien und Composites) einen hohen Übereinstimmungsgrad. Auch andere Autoren befaßten sich mit Versuchen in Zellkulturen. Von ihnen sind mehrere zum Teil sehr aufwendige und nicht leicht reproduzierbare Methoden an unterschiedlichen Zellarten und Zellstämmen beschrieben worden.
(6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 21, 22, 23)

2. THEMATIK

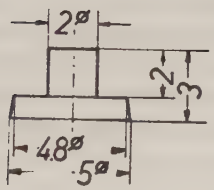
Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene serienmäßige Amalgame, darunter Non-Gamma-2-Amalgame, durch vergleichende Versuche in Zellkulturen auf ihre Toxizität hin zu untersuchen. Verwendet wurden nicht kontaminierte, diploide Hautfibroblasten eines menschlichen Foeten.

3. MATERIAL UND METHODEN

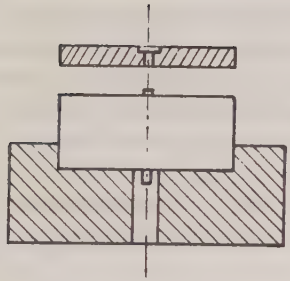
3.1. Matrize zur Herstellung der Prüfkörper

Zunächst mußten Form und Abmessung eines geeigneten Prüfkörpers festgelegt werden. Gewählt wurde ein kreisrundes Plättchen mit einem Durchmesser von 5 mm, einer Höhe von 1 mm und einem 2 mm hohen Stiel, der leichtes Greifen mittels einer Pinzette ermöglicht (Abb.1 oben). Die kreisrunde Form sollte eine radialhomogene Ausbreitung der zu erwartenden toxischen Substanzen und somit eine möglichst präzise Auswertung ermöglichen. Die zur Anfertigung der Amalgamproben erforderliche Stopfvorrichtung war relativ leicht herzustellen. Wie aus Abb.1 ersichtlich, besteht diese Vorrichtung aus einer Basisplatte, einem Mittelteil mit zwei zentrischen, unterschiedlich langen Dornen und der eigentlichen Formplatte mit einer Kavität, in die das Amalgam gestopft wird (Werkstoff: V2A). Während des Stopfens ragt der kürzere Dorn des Mittelteils in die Kavität der Formplatte. Nach Erhärten des Amalgams wird die Formplatte abgehoben und das Mittelteil herumgedreht, so daß bei erneutem Aufsetzen der Formplatte der Prüfkörper durch den längeren Dorn ausgestoßen wird.

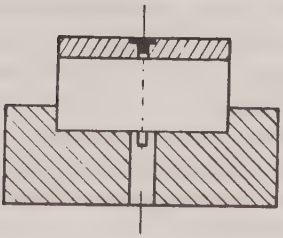
Abb. 1



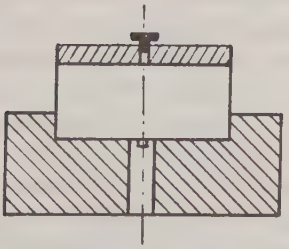
Prüfkörper
Maße in mm



Stopfvorrichtung



Prüfkörper gestopft



Ausstoßen des Prüfkörpers

3.2. Herstellung der Prüfkörper

3.2.1. Amalgam-Prüfkörper

Die Anfertigung der Proben erfolgte unter klinischen Bedingungen, d.h., sämtliche dazu notwendigen Instrumente, Behältnisse und Formen wurden zuvor im Heißluftsterilisator 30 min bei 180°C sterilisiert. Als Arbeitsunterlage diente eine sterilisierte Aluminiumfolie von entsprechender Größe.

Die Anmischung erfolgte in einem mechanischen Mischer*, wobei die von den verschiedenen Amalgamherstellern angegebenen Triturationszeiten und Mischungsverhältnisse von Quecksilber zu Feilung genau eingehalten wurden. Für jeweils zwei Proben wurden Quecksilber und Feilung auf einer Präzisionswaage in eine Anmischkapsel eingewogen. Dabei wurde so vorgegangen, daß zuerst einige Tropfen des schlechter dosierbaren Quecksilbers ausgewogen wurden und dann die entsprechende, errechnete Menge Feilung hinzugefügt wurde. Für jede untersuchte Amalgamsorte wurde eine eigene, gekennzeichnete Kapsel verwendet.

Beim Stopfen in die oben beschriebene Form wurde das Amalgam wie beim Legen einer Füllung Lage für Lage eingebracht und mit Kugelstopfern wachsender Größe gut kondensiert. Es wurde überstopft, der Überschuß wurde mit einem Heidemannspatel so entfernt, daß eine ebene Grundfläche entstand. Nach einer für jede Amalgamsorte empirisch ermittelten Aushärtezeit von wenigen Minuten ließen sich die Probekörper ohne Beschädigung aus der Form ausstoßen und mittels Pinzette in ebenfalls sterilisierte, verschließbare Glasbehältnisse legen, in denen sie bis zum Beginn des eigentlichen Versuches aufbewahrt wurden.

*Mechanischer Mischer: Silamat Fa. Vivadent

Die Proben wurden nicht poliert, um Berührung und andere unkalkulierbare Fehlermöglichkeiten, wie z.B. oberflächliche Hitzeeinwirkung, zu vermeiden.

Abgesehen von der genauen Einhaltung der vom Amalgamhersteller angegebenen Mischungsverhältnisse von Feilung zu Quecksilber und den Triturationszeiten, ist es zweckmäßig, die Prüfkörper eines Versuchs von derselben Person anfertigen zu lassen. So können durch unterschiedlichen Stopfdruck herrührende Abweichungen der Amalgamdichte reduziert werden.

Dentalamalgame (17) sind Quecksilberlegierungen, die durch Vermengen von flüssigem Quecksilber mit einer Legierung in Pulver- oder Tablettenform entstehen. Die chemische Zusammensetzung der zur Amalgamherstellung verwandten Legierungen soll nach der FDI-Spezifikation Nr.1 folgenden Voraussetzungen entsprechen:

Silber	min. 65%	Pulverkomponente = Feilung
Zinn	max. 29%	
Quecksilber	max. 3%	
Kupfer	max. 6%	
Zink	max. 2%	

Beim Anmischen mit Quecksilber (Flüssigkeitskomponente) reagieren diese Bestandteile untereinander und mit Quecksilber. Das abgebundene Amalgam besteht dann im wesentlichen aus drei Metallphasen, die als

Gamma-1-Phase (Ag_3Hg_4)
Gamma-2-Phase (Sn_7Hg) und
Gamma-Phase (Ag_3Sn) bezeichnet werden.

Die Gamma-2-Phase ist wegen ihres hohen Sn-Anteils in Bezug auf Korrosion und mechanische Festigkeit die schwächste der Phasen und ist daher weitestgehend bestimmend für Flow und Creep einer Füllung. Bei den Non-Gamma-2-Amalgamen wird ein Teil des Zinns durch eine

eutektische Silber-Kupfer-Legierung in Form feinster Kügelchen ersetzt. Dadurch wird die Bildung der unerwünschten Gamma-2-Phase so gut wie verhindert, es entsteht die Eta-Phase, und es werden damit festere korrosionsbeständigere Legierungen mit den Phasen

Gamma-Phase (Ag_3Sn)
Gamma-1-Phase (Ag_3Hg_4) und
Eta-Phase (Cu_6Sn_5) erzielt.(26)

3.2.2. Bezugssystem

Ein möglichst nicht toxisches Referenzmaterial sollte bei allen Untersuchungen als Kontrolle eingesetzt werden. Aus verschiedenen Werkstoffen (u.a. Elektrolytkupfer, Zahngoldlegierungen, eine CrCoMo-Legierung für Modellgußprothesen und verschiedenen Amalgamen) wurden je fünf Prüfkörper mit den gewählten Abmaßen hergestellt, in Äthylenoxyd sterilisiert und in einer Fibroblastenkultur getestet. Die untersuchte CrCoMo-Legierung* war am besten geeignet. Sie führte im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Materialien zu keinen mikroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Zellen.

Vergleichende Untersuchungen mit Amalgamproben, die unter klinischen Bedingungen gewonnen wurden, d.h. in steriler Stopfform mit sterilem Instrumentarium angefertigt und in sterilen Glasbehältern transportiert und solchen, die zusätzlich in Äthylenoxyd sterilisiert worden waren, ergaben keine Toxizitätsunterschiede. Um Veränderungen der Legierungen auszuschließen, wurde auf Versuche mit hitzesterilisierten Amalgamproben verzichtet.

*REMANIUM^R G-fh, Fa. DENTAURUM

3.2.3. Prüfkörper aus anderen Metallen

Die Referenzproben und die für die Vorversuche gefertigten Prüfkörper wurden, soweit sie aus Dentallegierungen bestanden, im Schleudergußverfahren hergestellt, wobei zur Ausformung der Wachsrohlinge die Stopfform diente. Die Proben aus Elektrolytkupfer wurden auf einer Mechaniker-Drehbank aus dem Vollen gedreht. Alle so erstellten Prüflinge mußten im Gegensatz zu den Amalgamproben wegen der Herstellungsweise vor den Versuchen gereinigt und 3o min bei 180°C sterilisiert werden.

3.3. Herstellung des Methylzellulose-Overlays

In einen sterilen 300 ml Erlenmeyerkolben wurden 2,8 g Methylzellulose (Dow Chemicals) eingewogen und mit Aqua bidest auf 100 g aufgefüllt. Das Gemisch wurde auf dem Luftbad im verschlossenen Kolben unter leichtem Schütteln bis zum Sieden erhitzt, wobei der Schliffstopfen des Kolbens festgehalten werden mußte. Unmittelbar nach Erreichen des Siedepunktes wurde der Kolben vom Luftbad entfernt und der Stopfen zum Druckausgleich kurz angehoben. Die Suspension mußte dann unter ständigem Schütteln erkalten. Bei Erreichen der Raumtemperatur war die Methylzelluloselösung trübe, teils flockig und von kleinen Luftblasen durchsetzt, die erst nach 12- bis 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank bei ca +4°C klar und blasenfrei wurde.

Als Nährlösung wurden 100 ml doppelt konzentriertes Minimum Essential Medium (Eagle) und 20 ml foetales Kälberserum mittels Magnetrührer eingerührt. Der so gewonnene Overlay konnte im Kühlschrank gelagert werden; vor Gebrauch wurde er ca. eine Stunde im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.4. Herstellung der Methylenblau-Lösung

3 g Methylenblau (Merck) wurden mit Aqua bidest auf 100 g aufgefüllt und heiß gelöst (Erwärmung im Wasserbad). Nach dem Erkalten wurde der nicht in Lösung gegangene Teil abfiltriert. Zum Anfärben der Zellen wurde nochmals 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnt.

3.5. Zellkulturen und Zellvermehrung

Zum Versuch wurden F2H-Zellen (Hautfibroblasten des Feten Nr.2) verwendet, die sich in der 10. bis 15. Passage befanden.

Zur Untersuchung der Prüfkörper wurden je 5 ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von 100 000 bis 150 000 Zellen pro ml in Petrischalen Typ 60/15 TC der Fa. Greiner eingesät. Die Inkubation erfolgte im Begasungsbrutschrank B 5060 E CO_2 der Fa. Heraeus in einer wasserdampfgesättigten 5%-CO_2-haltigen Atmosphäre. Nach zwei Tagen hatte sich ein gleichmäßiger, geschlossener Zellrasen ausgebildet.

3.6. Untersuchung der Prüfkörper auf Toxizität in der Zellkultur

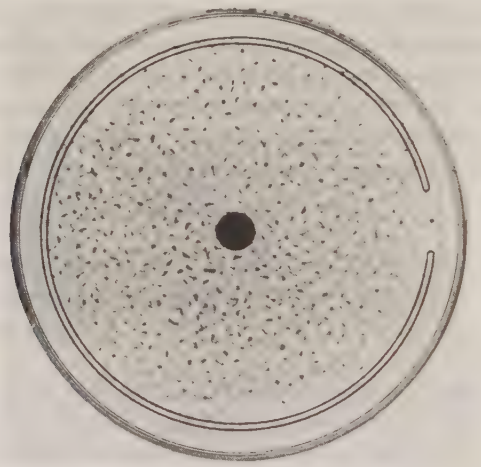
Vor dem Einsetzen der Prüfkörper wurde das Medium aus den Petrischalen entfernt und durch 5 ml Overlay ersetzt. Der Prüfkörper wurde in das Zentrum der Petrischale, direkt auf die Zellschicht gelegt.

Anschließend wurde nochmals zwei Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert, dann der Prüfkörper entnommen und

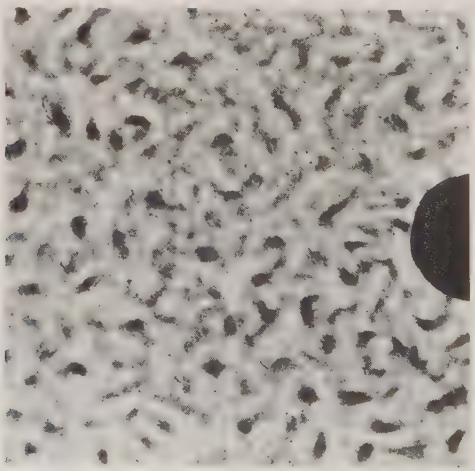
der Overlay vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der besseren Ablesbarkeit wegen wurde der Zellrasen mit Methylenblau angefärbt. Die toxisch veränderten Zellen lösten sich dabei ab oder färbten sich dunkelblau im Gegensatz zu den intakten Zellen, bei denen sich nur das Kernmaterial leicht anfärbte. Nach abschließendem Wässern war ein deutlicher Hof erkennbar, der über einer beleuchteten Unterlage (Röntgenbildbetrachtungsgerät) auf transparentes mm-Papier übertragen und ausplanimetriert wurde (Abb.2 u. 3).

Abb.2

Petrischale mit Referenzprobe aus CrCoMo :
Keine Schädigung des Zellrasens.



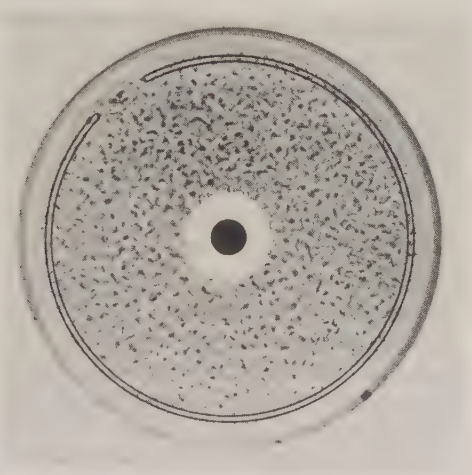
Vergrößerung: 1,5fach



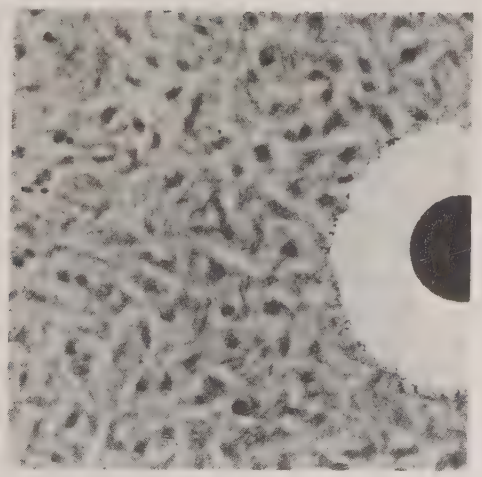
Vergrößerung: 5fach

Abb.3

Petrischale mit Amalgamprüfkörper:
Schädigung des Zellrasens, Hofbildung durch abgestorbene Zellen.



Vergrößerung: 1,5fach



Vergrößerung: 4fach

4. AUSWERTUNG VON VERSUCHSERGEBNISSEN

Zur Auswertung der Versuche wurden die durch toxisch veränderte bzw. abgestorbene Zellen entstandenen Bezirke auf transparentes mm-Papier übertragen und ausplanimetriert. Zwei Beispiele zeigen die Abbildungen 4 und 5. Bei allen Versuchen, auch bei denen mit Referenzproben, waren die Zellen unter den Prüfkörpern durch Druckeinwirkung zerstört. Diese Fläche von rund 20 mm² (entsprechend dem Prüfkörper-Durchmesser von 5 mm) konnte als Konstante unberücksichtigt bleiben und ist daher in allen Endergebnissen enthalten. Aus den gemessenen Werten wurden jeweils (entsprechend DIN 53 598) der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, der mittlere Fehler des Mittelwertes und der Vertrauensbereich der Mittelwerte für Aussagewahrscheinlichkeiten von P = 80%, 90%, 95% und 99% errechnet.

Der Vertrauensbereich (von $\bar{x}$-b bis $\bar{x}$+b) schließt den wahren Mittelwert $\bar{x}$ mit der angegebenen Aussagewahrscheinlichkeit P ein. (4, 24, 25)

Dabei sind:

$\bar{x}$ = Bestwert (Mittelwert)
x_i = Einzelwert
n = Anzahl der Einzelwerte
s = Standardabweichung
F = Mittlerer Fehler des Mittelwertes
P = Aussagewahrscheinlichkeit in %
b = Halbe Weite des Vertrauensbereiches
t = Faktor für n ≦ 30

Benutzte Formeln:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$s = \pm\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

$$F = \pm\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$$b = \frac{t}{\sqrt{n}}$$

Um auszuschließen, daß in der Übertragung der zellfreien Höfe auf mm-Papier und dem anschließenden Auszählen eine größere Fehlerquelle liegt, wurden wiederholte sorgfältige Auswertungen eines Versuches durch die gleiche Person und eine Kontrollauswertung durch eine zweite Person vorgenommen. Es ergaben sich nur unbedeutende Differenzen.

Abb.4

Von Petrischalen Übertragene Flächen (Vers.1, Amalgam Nr.2)

Abb.5

Von Petrischalen übertragene Flächen (Vers.1, Amalgam Nr.5)

5. VERSUCHSERGEBNISSE

Es wurden 6 handelsübliche Amalgame untersucht, die nachfolgend mit 1 bis 6 gekennzeichnet sind. Dabei handelte es sich um zinkhaltige und zinkfreie Legierungen des herkömmlichen Typs und des Non-Gamma-2-Typs:

Amalgam	Non-Gamma-2	zinkfrei	zinkhaltig
1	x		x
2	x	x	
3	x	x	
4			x
5		x	
6		x	

Insgesamt wurden 4 Versuchsreihen durchgeführt:

1. Untersuchung von je 30 Prüfkörpern und 5 Referenzprüfkörpern in 6 Versuchsansätzen.
2. Untersuchung von Prüfkörpern gleichen Alters; 5 Versuche mit je 10 Proben der einzelnen Amalgame und jeweils 5 Referenzprüfkörpern.
3. Ermittlung der Abhängigkeit der Toxizität vom Alter der Amalgamproben; Untersuchung von 2 Amalgamen und 5 Referenzprüfkörpern in 2 Versuchsansätzen.
4. Versuche mit reinem Quecksilber.

1. Versuchsreihe

Von jeder Amalgamsorte wurden 30 Prüfkörper, d.h., insgesamt 6 x 30 = 180 Stück hergestellt. Die Anzahl von n = 30 je Versuch wurde zunächst gewählt, um für die folgenden Versuche eine hinreichende Beurteilung der Streuung der Einzelwerte zu ermöglichen.

Die verschiedenen Amalgame wurden in 6 aufeinander folgenden Ansätzen entsprechend dem beschriebenen Testablauf mit jeweils 5 Referenzproben einer CrCoMo-Legierung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bedingt durch den relativ großen Zeitaufwand zum Herrichten der Prüfkörper und Zellkulturen und die Dauer der Einzelversuche, lag zwischen den Fertigungsdaten der Proben und den eigentlichen Versuchen im Begasungsbrutschrank eine größere Zeitspanne von z.T. mehreren Wochen.

Tabelle 1

Versuchsreihe 1, Meßergebnisse

Anzahl der Proben	Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.					
n	1	2	3	4	5	6
1	79	28	62	118	119	71
2	74	27	61	83	107	80
3	69	32	72	95	151	71
4	71	45	70	110	165	68
5	55	32	71	123	127	70
6	63	42	72	115	120	65
7	48	48	74	97	97	53
8	68	45	69	102	147	75
9	69	38	89	100	148	66
10	74	37	77	110	110	81
11	65	30	64	109	99	77
12	69	34	75	88	80	69
13	81	40	94	94	103	86
14	65	40	64	88	112	87
15	61	33	86	96	122	83
16	73	61	84	89	110	67
17	71	28	48	99	91	69
18	85	46	73	109	109	81
19	94	43	85	100	115	81
20	61	40	70	93	114	73
21	96	37	68	116	143	68
22	75	29	71	100	106	72
23	71	30	79	94	120	64
24	74	50	55	97	125	90
25	59	24	70	94	117	64
26	88	33	84	87	121	72
27	73	26	72	85	110	103
28	*	26	99	90	146	79
29	*	23	70	*	118	*
30	*	36	*	*	154	*
Mittelwert x	71,50	36,20	74,60	99,3	120,20	74,50
Standard-abweichung s	8,46	8,83	10,12	10,71	19,97	10,01
Abs. Fehler	±1,6mm²	±1,6mm²	±1,9mm²	±2,0mm²	±3,6mm²	±1,9mm²
Rel. Fehler	±3,0 %	±4,4 %	±2,5 %	±2,0 %	±3,0 %	±2,6%

* nicht auswertbar wegen Pilzinfektion

Bei allen 6 Versuchen wurden je 5 Petrischalen mit Referenzprüfkörpern untersucht. In keinem Fall konnte eine Intoxikation festgestellt werden. Auch bei mikroskopischer Betrachtung (Vergr. 60fach) ließen sich um den Probenrand herum keine toxisch veränderten Zellen beobachten.

2. Versuchsreihe

Um die auf das Alter der Prüfkörper möglicherweise zurückzuführenden Meßfehler weitgehend zu eliminieren, wurden für diese Untersuchungen ausschließlich gleichalte Prüfkörper verwendet, die am Abend vor dem Versuch gestopft wurden und die zwischen 12 und 15 Stunden alt waren.

Es wurden 5 Versuche mit jeweils 10 Proben von jeder Amalgamsorte und 5 Referenzproben angesetzt. Jeder Versuch wurde in 2 Ansätzen mit Zellen der gleichen Passage durchgeführt.

Die Resultate sind in den Tabellen 2 bis 12 wiedergegeben und in den Abbildungen 6 bis 8 graphisch dargestellt.

Tabelle 2

Versuchsreihe 2, Meßergebnisse
Versuch 1

Anzahl der Proben	Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.					
n	1	2	3	4	5	6
1	111	167	104	163	108	122
2	121	110	115	176	87	84
3	99	204	102	166	102	131
4	138	170	101	140	101	118
5	130	148	98	119	98	88
6	124	160	124	172	107	104
7	147	135	110	151	99	101
8	119	167	109	156	116	111
9	*	136	102	133	84	142
10	*	159	114	143	*	108
Mittelwert x	123,63	155,60	107,90	151,90	100,22	110,80
Standard-abweichung s	15,06	25,36	8,05	18,21	10,02	18,14
Abs. Fehler	±5,3mm²	±8,0mm²	±2,6mm²	±5,8mm²	±3,3mm²	±5,7mm²
Rel. Fehler	±4,3 %	±5,1 %	±2,4 %	±3,8 %	±3,3 %	±5,2 %

* nicht auswertbar wegen Pilzinfektion

Tabelle 3

Versuchsreihe 2, Meßergebnisse
Versuch 2

Anzahl der Proben	Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.					
n	1	2	3	4	5	6
1	111	116	98	101	114	110
2	114	133	93	136	90	75
3	116	159	102	150	78	104
4	123	111	84	107	104	110
5	121	133	85	131	101	96
6	146	108	88	137	128	92
7	128	114	104	117	102	78
8	111	111	95	153	99	130
9	120	131	99	135	90	93
10	120	119	105	134	97	81
Mittelwert x	121,00	123,50	95,30	130,10	100,30	96,90
Standard-abweichung s	10,30	15,69	7,66	16,98	13,72	17,60
Abs. Fehler	±3,3mm²	±5,0mm²	±2,4mm²	±5,4mm²	±4,3mm²	±5,4mm²
Rel. Fehler	±2,7 %	±4,0 %	±2,5 %	±4,1 %	±4,3 %	±5,6 %

Tabelle 4

Versuchsreihe 2, Meßergebnisse
Versuch 3

Anzahl der Proben	Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.					
n	1	2	3	4	5	6
1	114	122	101	110	*	91
2	112	116	104	133	*	91
3	118	112	102	148	*	94
4	118	111	109	119	*	86
5	106	116	108	126	*	93
6	134	110	94	130	*	87
7	100	118	101	112	*	100
8	107	113	94	117	*	108
9	97	116	95	127	*	93
10	108	132	*	131	*	*
Mittelwert x	111,40	116,60	100,89	126,20		93,67
Standard-abweichung s	10,55	6,48	10,04	10,27		6,75
Abs. Fehler	-3,3mm²	-2,0mm²	-2,0mm²	-3,2mm²		-2,3mm²
Rel. Fehler	-3.0 %	-1,8 %	-1,9 %	-2,6 %		-2,4 %

* nicht auswertbar wegen Pilzinfektion

Tabelle 5

Versuchsreihe 2, Meßergebnisse
Versuch 4

Anzahl der Proben	*Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.*					
n	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	*100*	*91*	*78*	*103*	*60*	*111*
2	*104*	*87*	*71*	*111*	*93*	*61*
3	*78*	*85*	*67*	*92*	*80*	*105*
4	*90*	*110*	*90*	*106*	*48*	*52*
5	*77*	*88*	*74*	*74*	*102*	*48*
6	*96*	*94*	*91*	*98*	*89*	*59*
7	*91*	*92*	*80*	*89*	*	*89*
8	*102*	*98*	*89*	*95*	*	*55*
9	*114*	*92*	*79*	*	*	*76*
10	*129*	*	*74*	*	*	*69*
Mittelwert x	*98,10*	*93.00*	*79,30*	*96,00*	*78,67*	*72,50*
Standard-abweichung s	*15,74*	*7,47*	*8,33*	*11,51*	*20,72*	*22,30*
Abs. Fehler	*±5,0mm²*	*±2,5mm²*	*±2,6mm²*	*±4,0mm²*	*±8,5mm²*	*±7,0mm²*
Rel. Fehler	*±5,0 %*	*±2,7 %*	*±3,3 %*	*±4,2 %*	*±10,7 %*	*±9,6 %*

* *nicht auswertbar wegen Pilzinfektion*

Tabelle 6

Versuchsreihe 2, Meßergebnisse
Versuch 5

Anzahl der Proben	Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm² bei Amalgam Nr.					
n	1	2	3	4	5	6
1	97	87	76	85	68	55
2	94	70	76	90	73	58
3	83	81	79	105	73	65
4	81	88	75	96	65	55
5	78	69	86	98	60	71
6	81	99	81	98	63	58
7	78	82	77	93	59	73
8	92	79	66	108	64	67
9	80	82	91	96	67	72
10	79	75	84	105	58	69
Mittelwert x	84,30	81,20	79,10	97,40	65,00	64,30
Standard-abweichung s	7,18	8,92	6,90	7,15	5,33	7,17
Abs. Fehler	±2,3mm²	±2,8mm²	±2,2mm²	±2,3mm²	±1,7mm²	±2,3mm²
Rel. Fehler	±2,7 %	±3,5 %	±2,8 %	±3,3 %	±2,6 %	±3,5 %

Abb.6

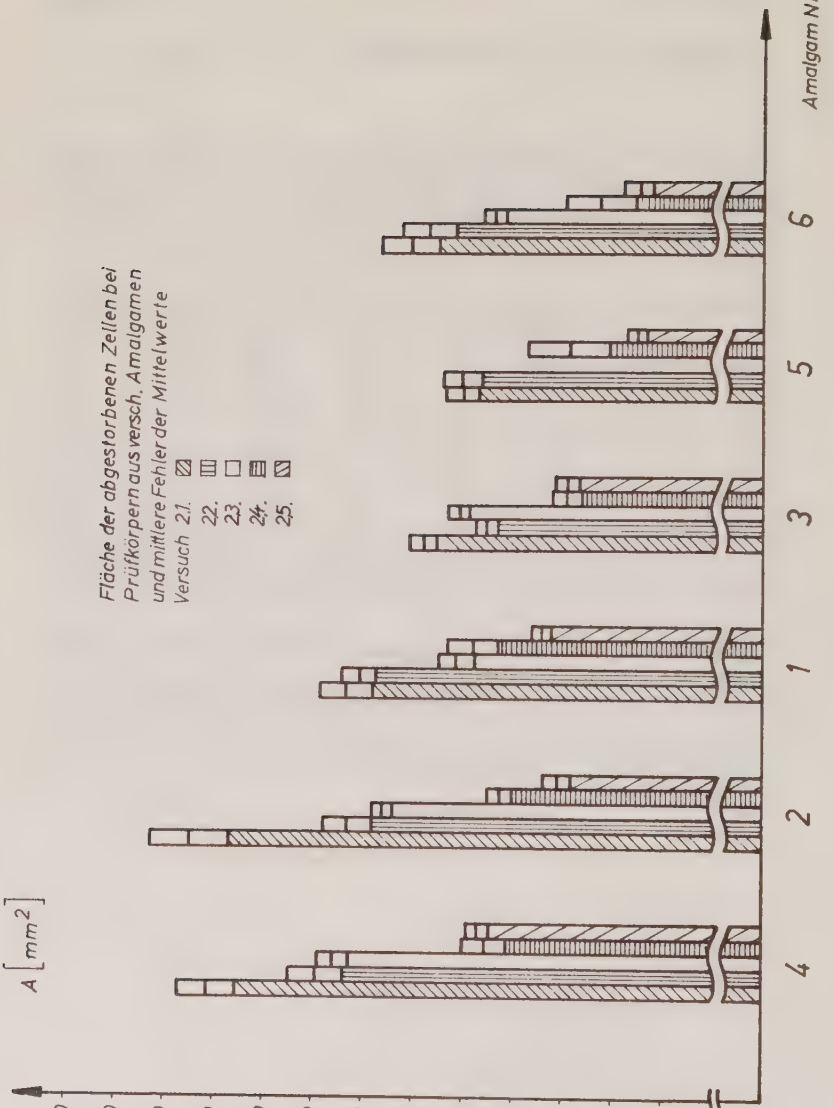

A [mm²]
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
Fläche der abgestorbenen Zellen bei Prüfkörpern aus versch. Amalgamen und mittlere Fehler der Mittelwerte
Versuch 21.
22.
23.
24.
25.
4
2
1
3
5
6
Amalgam Nr.

Tabelle 7

Versuchsreihe 2
Versuch 1

Errechnete Vertrauensbereiche der Mittelwerte $\bar{x}$
für Aussagewahrscheinlichkeiten
von P = 80%, 90%, 95% und 99%.

P	Amalgam Nr. 1	2	3	4	5	6
80%	116,09- 131,17	144,51- 166,99	104,38- 111,42	143,94- 159,86	95,55- 104,89	102,87- 118,73
90%	113,54- 133,72	140,90- 170,30	103,23- 112,57	141,34- 162,46	94,01- 106,43	100,23- 1021,32
95%	111,04- 136,22	137,46- 173,74	102,14- 113,66	138,87- 164,93	92,52- 107,92	97,82- 123,78
99%	105,00- 142,26	129,53- 181,67	99,63- 116,17	133,18- 170,62	89,01- 111,43	92,16- 129,44

Tabelle 8

Versuchsreihe 2
Versuch 2

Errechnete Vertrauensbereiche der Mittelwerte $\bar{x}$
für Aussagewahrscheinlichkeiten
von P = 80%, 90%, 95% und 99%.

P	Amalgam Nr. 1	2	3	4	5	6
80%	116,49- 125,51	116,64- 130,36	91,95- 98,65	122,67- 137,53	94,30- 106,30	89,44- 104,36
90%	115,03- 126,97	114,40- 132,60	90,86- 99,74	120,26- 139,94	92,35- 108,25	87,01- 106,79
95%	113.63- 128,37	112,28- 134,72-	89,82- 100,78	117,95- 142,25	90,49- 110,11	84,70- 109,10
99%	110,41- 131,59	107,37- 139,63	87,43- 103,17	112,65- 147,55	86,20- 114,40	79,37- 114,43

Tabelle 9

Versuchsreihe 2
Versuch 3

Errechnete Vertrauensbereiche der Mittelwerte $\bar{x}$
für Aussagewahrscheinlichkeiten
von P = 80%, 90%, 95% und 99%.

P	Amalgam Nr. 1	2	3	4	5	6
80%	106,79- 116,01	113,77- 119,43	96,21- 105,57	121,71- 130,69	* *	90,53- 96,81
90%	105,28- 117,52	112,84- 120,36	94,67- 107,11	120,25- 132,15	* *	89,49- 97,86
95%	103,85- 118,95	111,96- 121,24	93,17- 108,61	118,85- 133,55	* *	88,48- 98,86
99%	100,56- 122,25	109,94- 123,26	89,66- 112,12	115,64- 136,76	* *	86,12- 101,22

* nicht auswertbar wegen Pilzinfektion

Tabelle 10

Versuchsreihe 2
Versuch 4

Errechnete Vertrauensbereiche der Mittelwerte $\bar{x}$
für Aussagewahrscheinlichkeiten
von P = 80%, 90%, 95% und 99%.

P	Amalgam Nr. 1	2	3	4	5	6
80%	91,22- 104,98	89,52- 96,48	75,66- 82,94	90,24- 101,76	66,19- 91,15	62,75- 82,25
90%	88,98- 107,22	88,37- 97,63	74,47- 84,23	88,29- 103,71	61,63- 95,71	59,57- 85,43
95%	86,84- 109,36	87,26- 98,74	73,34- 85,26	86,37- 105,63	56,93- 100,41	56,55- 88,45
99%	81,92- 114,28	84,65- 101,35	70,74- 87,86	81,76- 110,24	44,57- 117,77	49,58- 95,42

Tabelle 11

Versuchsreihe 2
Versuch 5

Errechnete Vertrauensbereiche der Mittelwerte $\bar{x}$
für Aussagewahrscheinlichkeiten
von P = 80%, 90%, 95% und 99%.

P	Amalgam Nr. 1	2	3	4	5	6
80%	81,16- 87,44	77,30- 85,10	76,08- 82,12	94,27- 100,53	62,67 67,33	61,16- 67,44
90%	80,14- 88,46	76,03- 86,37	75,10- 83.10	93.26- 101,54	61,91- 68,09	60,14- 68,46
95%	79,16- 89,44	74,82- 87,58	74,16- 84,04	92,29- 102,51	61,19- 68,81	59,17- 69,43
99%	76,92- 91,68	72,03- 90,37	72.01- 86,19	90,05- 104,75	59,52- 70,48	56,93- 71,67

Abb. 7

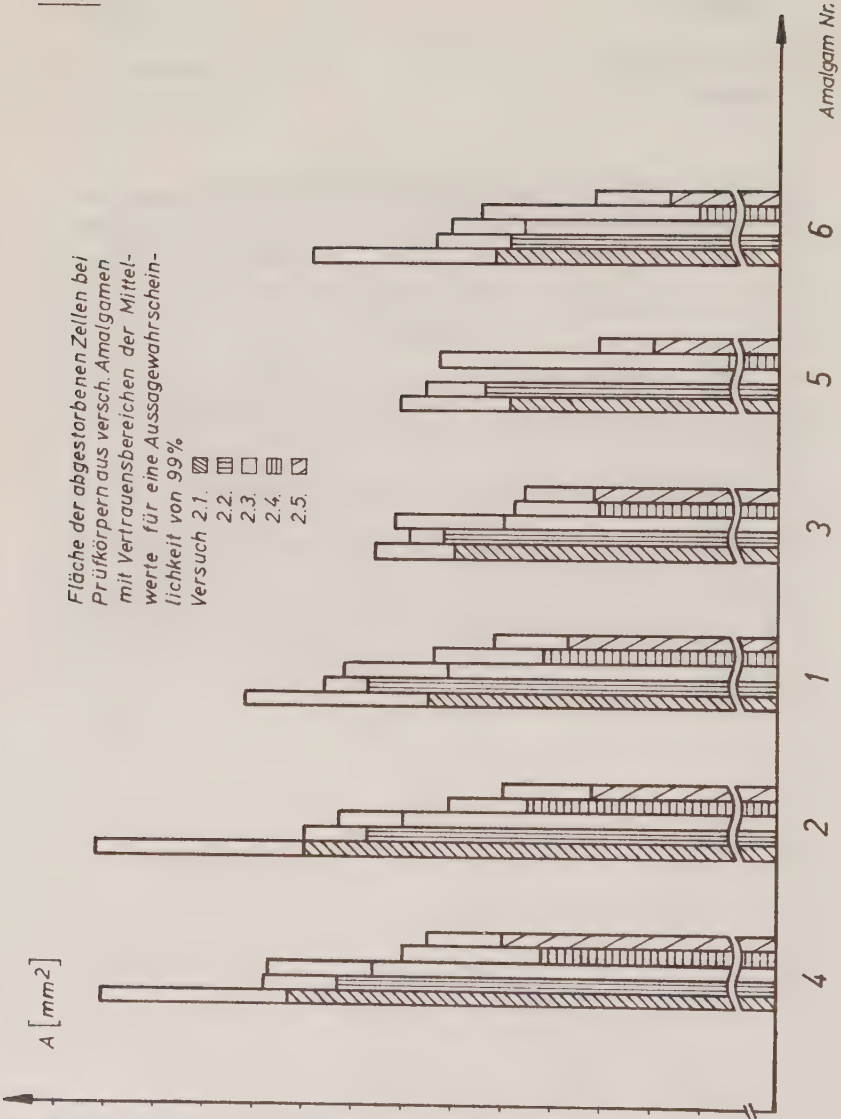

Fläche der abgestorbenen Zellen bei Prüfkörpern aus versch. Amalgamen mit Vertrauensbereichen der Mittelwerte für eine Aussagewahrscheinlichkeit von 99%
Versuch 2.1.
2.2.
2.3.
2.4.
2.5.
A [mm²]
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
4
2
1
3
5
6
Amalgam Nr.

Abb. 8

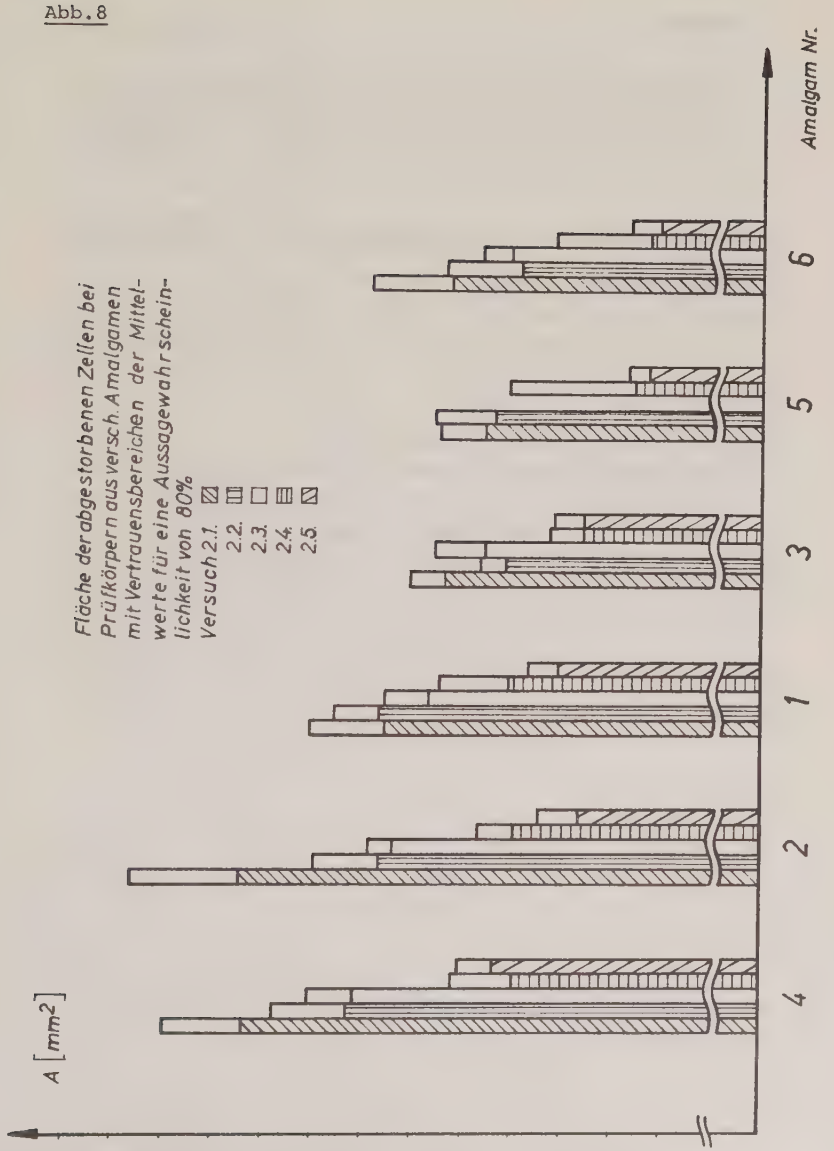

Fläche der abgestorbenen Zellen bei Prüfkörpern aus versch. Amalgamen mit Vertrauensbereichen der Mittelwerte für eine Aussagewahrscheinlichkeit von 80%
Versuch 2.1.
2.2.
2.3.
2.4.
2.5.
A [mm²]
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
4
2
1
3
5
6
Amalgam Nr.

Tabelle 12

In der folgenden Tabelle sind die untersuchten Legierungen nach den bereits oben angegebenen Charakteristiken mit fallender Toxizität (she. Abb.6) aufgeführt.

Toxizität	Amalgam Nr.	Non-Gamma-2	zinkfrei	zinkhaltig
	4			x
	2	x	x	
	1	x		x
	3	x	x	
	5		x	
	6		x	

3. Versuchsreihe

Da sich in den ersten beiden Versuchsreihen erhebliche Unterschiede in der Toxizität der einzelnen Amalgame gezeigt hatten, wurde in weiteren Testansätzen nach einer Abhängigkeit der Toxizität vom Alter der Prüfkörper gefahndet.

Zwei Amalgame wurden ausgewählt, das Amalgam Nr.2, das in der ersten Versuchsreihe die geringste Toxizität gezeigt und das Amalgam Nr.4, das die zweithöchste Zellzerstörung verursacht hatte.

Vor Versuchsbeginn im Begasungsbrutschrank wurden an 14 aufeinander folgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit jeweils 2 Prüfkörper angefertigt. Beim letzten Versuch mit Amalgam Nr.2 wurden darüber hinaus noch Proben 21, 15, 9 und 3 Stunden vor Versuchsbeginn hergestellt, um ein besseres Bild im Anfangsbereich des zu ermittelnden Kurvenverlaufs zu erhalten. Bei allen Versuchen wurden wiederum Referenzproben mitgeführt.

Tabelle 13

Versuchsreihe 3

Probenalter t		Fläche der abgestorbenen Fibroblasten A in mm² und Mittelwert $\bar{A}$					
[d]	[h]	Amalgam Nr.2			Amalgam Nr.4		
		A_1	A_2	$\bar{A}$	A_1	A_2	$\bar{A}$
0,125	3	104	137	120,5			
0,375	9	76	66	71,0			
o,625	15	73	82	77,5			
0,875	21	78	72	75,0			
1,000					96	126	111,0
2		58	59	58,5	105	109	107,0
3		53	54	53,5	108	89	98,5
4		49	52	50,5	98	95	96,5
5		43	59	51,0	101	106	103,5
6					85	92	88,5
7		45	48	46,5	92	90	91,0
8		46	52	49,0			
9		43	42	42,5	97	92	94,5
10		49	46	47,5	99	83	91,0
11		50	55	52,5	93	85	93,5
12		46	49	47,5	95	87	91,0
13					89	97	93,0
14					79	85	82,0

Bei beiden Versuchen wurden je 5 Petrischalen mit Referenzprüfkörpern untersucht. In keinem Fall konnte eine Intoxikation festgestellt werden. Auch bei mikroskopischer Betrachtung (Vergrößerung 60-fach) ließen sich um den Probenrand herum keine toxisch veränderten Zellen beobachten.

Aus den erhaltenen Werten ist ersichtlich, daß mit größer werdendem Alter der Prüfkörper die Toxizität des Amalgams abnimmt. Dies ist bei Amalgam Nr.2 zunächst deutlicher zu erkennen als bei Amalgam Nr.4 . Die Abhängigkeit der zerstörten Zellfläche vom Alter der Prüfkörper müßte demnach einer Exponentialfunktion der allgemeinen Form

$$A = A_o \cdot e^{-k \cdot t}$$ folgen.

Dabei sind:

A = Fläche der zerstörten Zellen in mm² zur Zeit t in Tagen

A_o = Fläche der zerstörten Zellen in mm² zur Zeit t = 0

-k = eine Abklingkonstante

e = Basis der natürlichen Logarithmen

Da unabhängig von der zu untersuchenden Toxizität in jedem Fall eine der Grundfläche des Prüfkörpers entsprechende Fläche von 20mm² zerstört wird, muß die Funktion für den vorliegenden Fall heißen:

$$A = A_o \cdot e^{-k \cdot t} + 20$$

Zur mathematischen Ermittlung der Kurve, die bei A = 20mm² asymptotisch gegen ∞ verlaufen muß, sind also 20mm² abzuziehen.

Da bei der Auswertung ein Rechner benutzt wurde, der nur bei linearer Regression aus Wertepaaren die optimale Anpassungs g e r a d e errechnen kann, wurde die obige Gleichung durch Logarithmieren in die Form einer Geraden umgewandelt, anhand der umgerechneten Wertepaare optimiert und anschließend wieder potenziert:

$$A-20 = A_o \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$\ln(A-20) = \ln A_o + \ln e(-k \cdot t)$$

$$\ln(A-20) = -k \cdot t + \ln A_o$$

Diese Gleichung entspricht der allgemeinen Form einer Geraden $y = mx + b$

In der Tabelle 14 sind die bei den Amalgamen Nr.2 und Nr.4 gemessenen Werte für t und A, die entsprechenden Werte für (A-20) und ln(A-20) sowie die Ergebnisse des Rechners wiedergegeben.

Die vom Rechner gefundene Anpassungsgerade hat demnach für Amalgam Nr.2 eine Steigung von $m = -0,075$ und bei $x = 0$ einen Schnittpunkt auf der Ordinate bei $y = 3,97$. Die gesuchte Gerade heißt somit:

$$\ln(A-20) = -0,075 \cdot t + 3,97$$

Durch Potenzieren ergibt sich:

$$A-20 = e^{-0,075 \cdot t} \cdot e^{3,97}$$

Die gesuchte Funktion für Amalgam Nr.2 lautet also:

$$\boxed{A = 52,9 \cdot e^{-0,075 \cdot t} + 20}$$

Analog dazu ergibt sich für Amalgam Nr.4 die Funktion:

$$\boxed{A = 86,5 \cdot e^{-0,020 \cdot t} + 20}$$

In der Tabelle 15 sind mit diesen Formeln die theoretischen Flächen für vorgegebene Zeiten errechnet worden, um daraus die gesuchten Kurven (Abb.9) zeichnen zu können. In einer weiteren Graphik (Abb.10) wurden zum Vergleich die gemessenen Ausgangswerte und die daraus errechneten theoretischen Kurven gemeinsam aufgetragen.

Tabelle 14

Versuchsreihe 3

Probenalter t		A = mittlere Fläche der abgestorbenen Fibroblasten in mm²					
[d]	[h]	Amalgam Nr.2			Amalgam Nr.4		
		A	(A-20)	ln(A-20)	A	(A-20)	ln(A-20)
0,125	3	120,5	100,5	4,61			
0,375	9	71,0	51,0	3,93			
0,625	15	77,5	57,5	4,05			
0,875	21	75,0	55,0	4,01			
1,000					111,0	91,0	4,51
2		58,5	38,5	3,65	107,0	87,0	4,47
3		54,5	34,5	3,54	98,5	78,5	4,36
4		50,5	30,5	3,42	96,5	76,5	3.34
5		51,0	21,0	3,05	103,5	83,5	4,42
6					88,5	68,5	4,23
7		46,5	26,5	3,28	91,0	71,0	4,26
8		49,0	29,0	3,37			
9		42,5	22,5	3.09	94,5	74,5	4,31
10		47,5	27,5	3,31	91,0	71,0	4,26
11		52,5	32,5	3.48	89,0	69,0	4,23
12		47,5	27,5	3,31	91,0	71,0	4,26
13					93,0	73,0	4,29
14					82,0	62,0	4,13

Aus den angegebenen Wertepaaren ln(A-20) / t [d]
ermittelte der Rechner Anpassungsgeraden
für Amalgam Nr.2 : $\ln(A-20) = -0{,}075 \cdot t + 3{,}97$
für Amalgam Nr.4 : $\ln(A-20) = -0{,}020 \cdot t + 4{,}46$

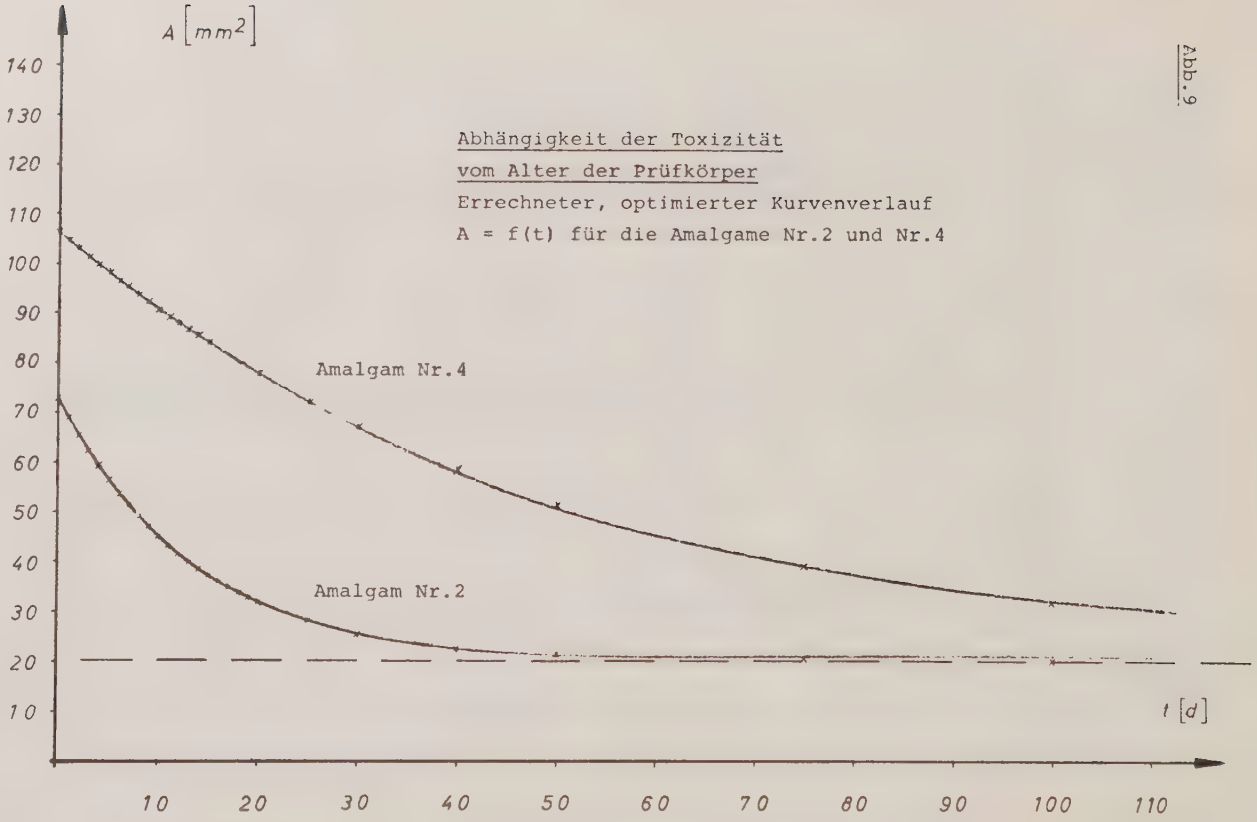
Tabelle 15

Versuchsreihe 3

Errechnete Wertepaare der ermittelten Funktionen zur Darstellung der Kurven (Abb.9 und 10)

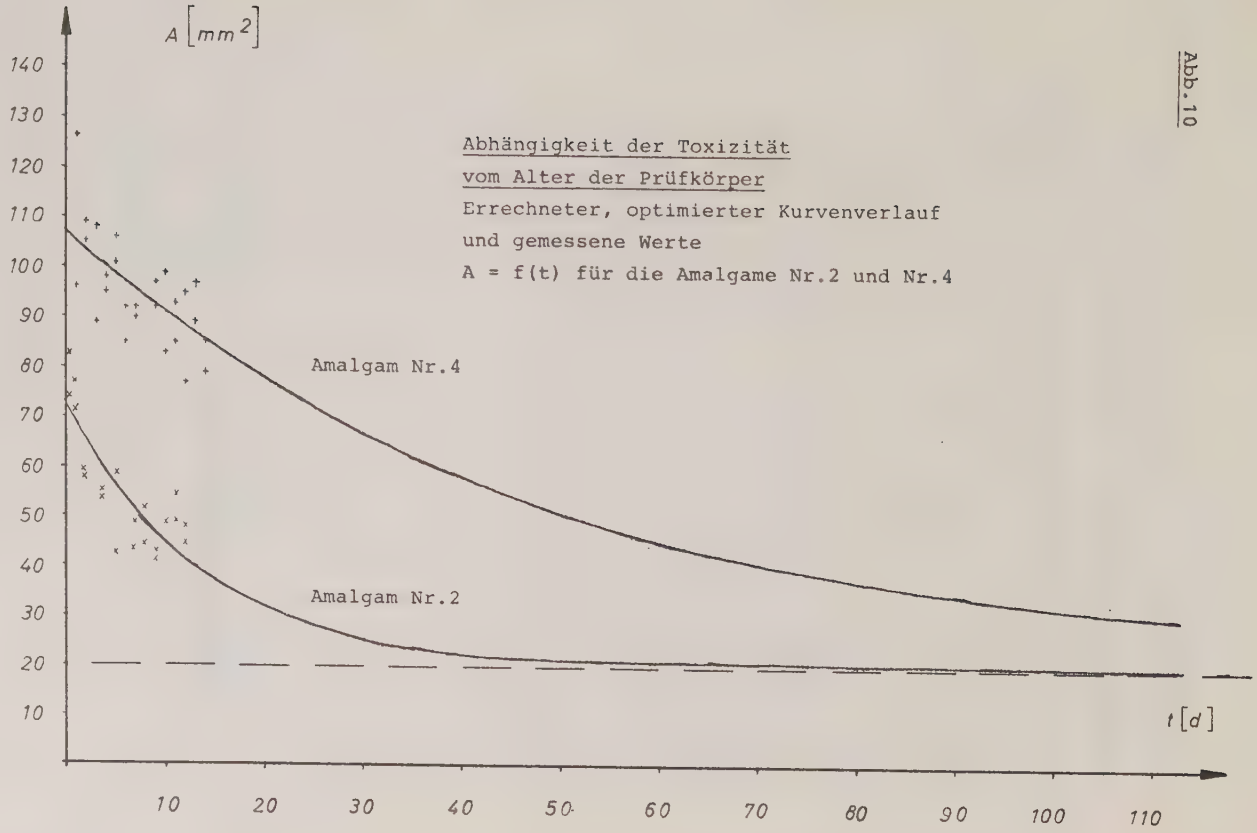
t[d]	Amalgam Nr.2 A in mm²	Amalgam Nr.4 A in mm²
0,00	72,9	106,5
0,25	71,9	106,1
0,50	70,9	105,6
0,75	70,0	105,2
1,00	69,1	104,8
2	69,5	103,1
3	62,3	101,5
4	59,2	99,8
5	56,4	98,3
6	53,8	96,7
7	51,3	95,2
8	49,1	93,7
9	47,0	92,3
10	45,1	90,8
11	43,3	89,4
12	41,6	88,0
13	40,0	86,7
14	38,6	85,4
15	37,3	84,1
16	36,0	82,8
17	34,9	81,6
18	33,8	80,3
19	32,8	79,2
20	31,9	78,0
25	28,2	72,5
30	25,6	67,5
40	22,7	58,9
50	21,3	51,8
60	20,96	46,1
70	20,28	41,3
80	20,13	37,5
90	20,06	34,3
100	20,03	31,7
200	20,00	21,6
300	20,00	20,2
500	20,00	20,0

Abb.9



Abhängigkeit der Toxizität
vom Alter der Prüfkörper
Errechneter, optimierter Kurvenverlauf
A = f(t) für die Amalgame Nr.2 und Nr.4

Abb. 10



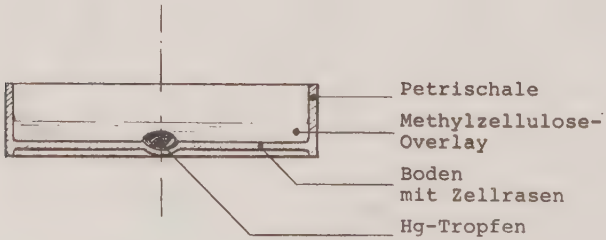
Abhängigkeit der Toxizität
vom Alter der Prüfkörper
Errechneter, optimierter Kurvenverlauf
und gemessene Werte
A = f(t) für die Amalgame Nr.2 und Nr.4

4. Versuchsreihe

Quecksilber nach DAB 6 als Probematerial

Die verwendeten Petrischalen sind im Spritzgußverfahren aus einem Thermoplast hergestellt. Daher war es möglich, mit der halbkugelförmigen Oberfläche eines über der Flamme erhitzten kleinen Reagenzglases in die Mitte des Bodens der Schälchen unter sterilen Verhältnissen kreisrunde Mulden zur Aufnahme eines Quecksilbertropfens zu drücken. Aus einer Reihe so präparierter Petrischalen wurden 6 Stück mit 5mm Muldenranddurchmesser ausgesucht, der Rest wurde verworfen. An einer Schale wurde unter Berücksichtigung des Gewichtsverlustes durch den Overlay ermittelt, wie schwer der Hg-Tropfen sein mußte, um den gewünschten Probendurchmesser von 5mm zu erhalten.
In 5 mit Zellrasen und Overlay versehenen Schalen wurde die abgewogene Hg-Probe aus einem Glasröhrchen durch den Overlay in die Mulde getropft. Anschließend kamen die Petrischalen unter Vermeidung von Erschütterungen in den Brutschrank. Auch bei diesem Versuch wurden einige Referenzproben mitgeführt.

Abb.11



Bei den Versuchen mit Quecksilber zeigten schon nach einem Tag Inkubationszeit sämtliche Proben große Höfe zerstörter Zellen. Nach 2 Tagen waren alle Zellen in den Schalen abgestorben. Bei den mitgeführten Referenzproben waren wie stets keine Veränderungen zu beobachten, die intakten Fibroblasten bedeckten den Schalenboden bis zum Probenrand.

6. DISKUSSION

Wie eingangs bereits bemerkt, ist es sinnvoll, bei der biologischen Werkstoffprüfung mit Toxizitäts- und Eliminationstests zu beginnen. Dabei ist primär von Interesse, ob der zu untersuchende Werkstoff toxisch ist oder nicht und wie er sich - gegebenenfalls - im Verhältnis zu anderen, bereits bewährten oder verworfenen Materialien verhält. Eine spezielle, differenzierte Aussage wird in diesem Untersuchungsstadium noch nicht verlangt. Die hier beschriebene Methode stellt ein einfaches Prüfverfahren von Amalgamen in der Zellkultur dar, das ohne großen Aufwand relativ schnell zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Im Hinblick auf eine bereits zur Diskussion stehende Normierung der biologischen Werkstoffprüfung wurden diploide Hautfibroblasten eines menschlichen Feten verwendet. Diese nicht kontaminierten F2H-Zellen ohne Chromosomenaberration bieten wegen ihrer Herkunft gegenüber anderen zur biologischen Werkstoffprüfung - vorwiegend bei nicht zahnärztlichen Werkstoffen - verwendeten Zellstämmen meist tierischer Herkunft wie z.B. HeLa-Zellen (21, 22), Maus-Fibroblasten (7, 13, 14), embryonale Hühnerzellen (7), embryonale Rattenzellen (12) und Kaninchen-Nierenzellen (6), den Vorteil, daß die an ihnen gewonnenen Versuchsergebnisse bedeutend besser auf den menschlichen Organismus zu übertragen sind. Als diploide Zellen besitzen sie einen normalen Zellstoffwechsel und wachsen in einen gleichmäßigen Monolayer aus (15). Letzteres ist für die Reproduzierbarkeit von Bedeutung. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß die einzige, bisher zur Humanimpfstoff-Produktion zugelassene Zellinie, die diploide, aus menschlichem, fetalem Lungengewebe isolierte Zellinie WI 38 (2) ist. Auf Grund dieser

Tatsachen und der erzielten Versuchsergebnisse wäre es für eine Normierung biologischer Testmethoden empfehlenswert, eine bekannte Zellinie für Testversuche einzusetzen.

Der verwendete Methylzellulose Overlay ist besser geeignet als der von Guess et al (5, 7, 1) angegebene Agar Overlay. Während der Agar Overlay wegen seiner hohen Viskosität bei niedrigen Temperaturen schwierig zu handhaben ist und bei höheren Temperaturen zu Zellschädigungen führt, ist die Methylzellulose ohne Schwierigkeiten gut dosierbar zu applizieren. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, daß die Dicke des Methylzellulose Overlays nur von untergeordneter Bedeutung ist, da der Prüfkörper durch die Methylzellulose sinkt und direkt dem Zellrasen aufliegt, während bei der Agar Methode sich der Prüfkörper a u f dem Agar Overlay befindet. Dieser Umstand kann Fehler zur Folge haben, da jede Abweichung der Overlaydicke eine mindest gleich große Abweichung der Diffusionsstrecke durch den Agar ergibt. Bei der von Klötzer (10) angegebenen modifizierten Methode nach Guess (7, 18) werden die Zellen bereits unmittelbar nach Aufbringen des Agar Overlays mit Neutralrot angefärbt. Dazu heißt es: " Die Kultur muß von nun an vor jeglichem Lichteinfluß geschützt werden, da Licht in Verbindung mit Neutralrot die L-Zellen schädigt." Bei unserer Methode werden die Zellen erst am Versuchsende angefärbt, so daß eine etwaige Beeinflussung des Ergebnisses durch einen längere Zeit einwirkenden Farbstoff oder durch Lichtexposition ausgeschlossen ist. Das hat den Vorteil, daß der Verlauf der Versuche - auch durch mikroskopische Betrachtung der Zellen - jederzeit kontrolliert werden kann.

Spangberg(19) gibt zur Prüfung zahnärztlicher Materialien eine Methode an, bei der HeLa-Zellen mit ^{51}Cr markiert

werden. Nach Kontaminieren der Zellen mit dem zu prüfenden Material wird eine dem Verhältnis der zerstörten Zellen entsprechende Menge ^{51}Cr freigesetzt, die mit einem Gammazähler gemessen wird. Abgesehen von der Art der benutzten Zellen ist diese Methode sehr aufwendig und daher nur in Laboratorien durchzuführen, die mit einem Gammazähler ausgerüstet sind.

Puza und Novak (13, 14) geben eine Prüfmethode an, bei der Langzeitbeobachtungen vorgenommen und Veränderungen an den Zellorganellen kinematographisch festgehalten werden, eine Technik, die unseres Erachtens über den Rahmen von Screening-Tests hinausgeht.

Unsere Untersuchungen an menschlichen embryonalen Fibroblasten erlauben eine Aussage über Toxizitätsunterschiede handelsüblicher Amalgame. Der Vergleich mit Referenzproben aus einer nicht toxisch wirkenden CrCoMo-Legierung und einem stark zellschädigenden Werkstoff (Quecksilber) ermöglicht darüber hinaus eine gewisse Einstufung innerhalb eines Toxizitätsbereichs von 0% bis 100%.

Die Auswertung der Meßdaten der ersten Versuchsreihe, bei der für jede der 6 untersuchten Amalgamsorten je ein Einzelversuch mit 30 Prüfkörpern durchgeführt wurde, ergab mittlere Fehler der Mittelwerte von 2% bis 4,4%. Diese, für Versuche solcher Art, sehr guten Resultate bestätigen die gewählte Methode und das Verfahren der Auswertung.

Die zweite Versuchsreihe bestand aus 5 Einzelversuchen mit je 10 Prüfkörpern eines Amalgams gleichen Alters. Sie waren 12 bis 15 Stunden vor Versuchsansatz hergestellt worden. Wegen der kleineren Probenzahl n kam es erwartungsgemäß zu einer größeren Streuung der Fehler-

grenzen. Trotzdem ergaben sich nach Berechnung der Vertrauensbereiche der Mittelwerte für Aussagewahrscheinlichkeiten bis zu 99% zwischen den ermittelten Toxizitätswerten einzelner Amalgame noch signifikante Unterschiede.

Auf Grund der bei den ersten zwei Versuchsreihen zu beobachtenden Toxizitätsunterschiede der einzelnen Amalgamsorten, schien sich die Annahme zu bestätigen, daß zwischen der Toxizität und dem Alter der Prüfkörper eine Abhängigkeit besteht.

Erst eine dritte Versuchsreihe ergab Aufschluß über die Beziehungen zwischen der Toxizität der Prüfkörper und ihrem Alter. Die aus den Meßergebnissen dieser Untersuchungen ermittelten Kurven zeigen für verschiedene Amalgamsorten unterschiedliche Abklingkonstanten, d.h., die Toxizität verschiedener Amalgame nimmt mit zunehmendem Alter unterschiedlich stark ab. Alle Prüfkörper der zweiten Versuchsreihe waren mit 12 bis 15 Stunden annähernd gleich alt, während die Prüfkörper der ersten Versuchsreihe zu unterschiedlichen Zeiten angefertigt worden waren und beim Versuchsansatz mindestens 2 bis 4 Wochen alt waren. Aus den Kurven ergibt sich allerdings, daß ein Probenalter von 12 bis 15 Stunden ungünstig ist. Man befindet sich dann im steilen Anfangsbereich, in dem schon geringe Altersdifferenzen relativ große Toxizitätsunterschiede ergeben. Dies führt in Verbindung mit der bereits erwähnten niedrigeren Probenzahl zu größeren Fehlerbreiten und Vertrauensbereichen der Mittelwerte.

Die gemessenen Toxizitätswerte der Einzelversuche wurden unter Berücksichtigung der errechneten Fehlergrenzen bzw.

der Vertrauensbereiche der Mittelwerte für Aussagewahrscheinlichkeiten von 80% und 99% graphisch dargestellt und nach fallender Toxizität der Amalgame eingeordnet. Dabei zeigte sich, daß alle Ergebnisse jeweils eines Versuches insgesamt entweder niedriger oder höher liegen als die der übrigen Einzelversuche. Die Ursache dafür könnte, wegen der stets gleichen Versuchsbedingungen, in einer unterschiedlichen Reaktionslage der jeweils für einen Versuch gesondert zubereiteten Fibroblasten zu suchen sein. Ein Zusammenhang mit der jeweiligen Passagenzahl bestand nicht. Diese Erscheinung ist überdies wenig von Belang, da sie die hier gewünschte, vergleichende Aussage nicht beeinflußt.

Die untersuchten Non-Gamma-2-Amalgame liegen an zweiter, dritter und vierter Stelle und somit im Mittelfeld der gefundenen Toxizitätsskala. Die zinkhaltigen Amalgame scheinen etwas toxischer zu sein, während die zinkfreien Amalgame überwiegend am unteren Ende der Skala liegen.

Unsere Untersuchungen lassen gewisse Parallelen zu Beobachtungen erkennen, die nach Legen größerer Amalgamfüllungen gemacht wurden: Über ca. 3 Monate fand sich bei den Patienten eine erhöhte Quecksilberausscheidung in Harn und Faeces (3). Dies läßt darauf schließen, daß die Toxizität von Amalgamen zumindest teilweise auf die Abgabe von überschüssigem, nicht gebundenem Quecksilber zurückzuführen ist (11, 16).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf Versuchen an handelsüblichen Dentalamalgamen, deren zellschädigende Wirkung in Beziehung gesetzt wurde zu den Referenzmaterialien CrCoMo und Hg, einem nicht schädigendem und einem stark toxischen Material. Weitere vergleichende Untersuchungen mit gleicher Technik an anderen

bereits klinisch erprobten zahnärztlichen Materialien und Implantatwerkstoffen sollten sich anschließen, um die Brauchbarkeit und Nützlichkeit unserer Methode zu überprüfen. Dabei sollte man beachten, daß dies nur e i n e Methode im Hinblick auf die Materialprüfung ist. Sie sollte nicht allein, sondern nur im Zusammenhang mit der Vielzahl anderer Methoden der Werkstoffprüfung zur definitiven Beurteilung eines Materials herangezogen werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Der Bedarf an artfremden Materialien als Ersatz für defekte organische Substanz steigt ständig. Da nur sehr wenige Werkstoffe vom Organismus toleriert werden, bedarf es vor der Anwendung außer werkstofftechnischer auch umfangreicher biologischer Prüfungen. Ergebnisse aus Untersuchungen in der Zellkultur könnten dabei wegweisend sein. Durch Versuche mit menschlichen embryonalen Fibroblasten wurde eine leicht reproduzierbare Methode entwickelt, die es gestattet, in vitro die Toxizität von Dentalamalgamen zu untersuchen, quantitativ zu erfassen und Vergleiche mit anderen Werkstoffen durchzuführen.

Als Referenzmaterial diente eine nicht toxische Dental-Guß-Legierung (CrCoMo). Eine weitere Kontrolle war das stark toxische Quecksilber. Es wurden 6 handelsübliche Amalgame, darunter neue Non-Gamma-2-Amalgame untersucht und miteinander und mit den Referenzproben verglichen. Bei einigen Amalgamen ergaben sich signifikante Toxizitätsunterschiede. Die Non-Gamma-2-Amalgame besaßen eine mittlere Toxizität und lagen zwischen den stärker schädigenden zinkhaltigen und den weniger toxischen zinkfreien Amalgamen. Zwei Amalgamsorten wurden zu weiteren Versuchen herangezogen. Bei diesen Untersuchungen stellte sich eine Abhängigkeit der Toxizität vom Alter der Prüfkörper heraus. Auf Grund statistischer Berechnungen konnte festgestellt werden, daß die Toxizität unterschiedlicher Amalgame mit fortschreitendem Alter verschieden stark abnimmt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1) AUTIAN, J.: General toxicity and screening tests for Dental Materials. Int. dent. J. 24, 235 (1974)

2) BONIN, O., HÖVEL, H.: Diploide Zellen: Substrat für Virus-Impfstoff-Produktion. Die gelben Hefte XIII, 61-67 (1973)

3) BORINSKI, P.: Das Vorkommen kleinster Quecksilbermengen in Harn und Faeces. Klin. Wschr. 10, 149 (1931)

4) CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1964)

5) DULBECCO, R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38, 747 (1952)

6) GALIN, M. A., CHOWCHUVECH, E. and GALIN, A.: Tissue culture methods for testing the toxicity of occular plastic materials. Amer. I. Ophtalmol. 79, 665 (1975)

7) GUESS, W. L., ROSENBLUTH, S. A., SCHMIDT, B. and AUTIAN, J.: Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J. Pharm. Sci. 54, 1545 (1965)

8) JACOBSEN, N.: Epithelial-like cells in culture derived from human gingiva: response to Nickel. Scand. J. Dent. Res. 85, 567-574 (1977)

9) KLÖTZER, W. T.: Prüfung der biologischen Reaktionen der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe. Dtsch. zahnärztl. Z. 30, 126-131 (1975)

10) KLÖTZER, W. T.: Empfohlene standardisierte Prüfverfahren zur biologischen Beurteilung zahnärztlicher Materialien. AA "Biologische Werkstoffprüfung", Entwurf, (1976)

11) KÜHL, W.: Die Quecksilberdampfabgabe von Amalgamfüllungen. Dtsch. zahnärztl. Z. 21, 496 (1966)

12) NEUPERT, G. und WELKER, D.: Bestimmung der Gewebsverträglichkeit stomatologischer Werkstoffe an Zellkulturen. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkd. 63, 134-141, (1975)

13) NOVAK, L. und PUZA, V.: Einige Methoden zur biologischen Testung der stomatologischen Materialien mittels Zellkulturen. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkd. 65, 859-862 (1977)

14) NOVAK, L. und PUZA, V.: Neue Methode zur Bestimmung der Gewebsverträglichkeit stomatologischer Materialien an Zellkulturen. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkd. 65, 863-866 (1977)

15) PAUL, J.: Zell- und Gewebekulturen, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1980)

16) POTH, E.: Systematische Zusammenstellung aller in der Literatur auffindbaren Krankenfälle, sowohl lokaler als auch allgemeiner Art, als deren Ursache Amalgamfüllungen in der Mundhöhle genannt werden. Inaugural-Dissertation, München(1957)

17) RIETHE, P.: Die Quintessenz der Amalgamfüllung Buch- und Zeitschriftenverlag Die Quintessenz, Berlin (1971)

18) ROSENBLUTH, S. A., WEDDINGTON, G. R., GUESS, W. L. and AUTIAN, J.: Tissue culture method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J. Pharm. Sci. 54, 156 (1956)

19) SPANGBERG, L.: Kinetic and quantitative evaluation of material toxicity in vitro. Oral Surg. 35, 389 (1973)

20) SPANGBERG, L.: Correlation of in vivo and in vitro screening tests - Symposium on Methodology And Criteria In The Evaluation Of Biologic Effects Of Dental Materials. Pulp Biology Group International Association of Dental Research, Copenhagen (1977)

21) SPANGBERG, L. and LANGELAND, K: Biologic Effects of Dental Materials. 1. Toxicity of Root Canal Filling Materials on HeLa Cells In Vitro. Oral Surg. 35, 402-414 (1973)

22) SPANGBERG, L., RODRIGUES, H., LANGELAND, L. and LANGELAND, K.: Biologic Effects of Dental Materials. 2. Toxicity of Anterior Tooth Restorativ Materials on HeLa Cells In Vitro. Oral Surg. 36, 713-724 (1973)

23) SLOTOSCH, P.: Biologische Testmethoden in der deutschsprachigen Literatur und ihre Bedeutung für die Zahnheilkunde. Dissertation, Berlin (1972)

24) Statistische Auswertung, DIN 53598

25) SWOBODA, H.: Knaurs Buch der modernen Statistik, Droemersche Verlagsanstalt, Th. Knaur Nachf. München / Zürich (1974)

26) VIVADENT : Die Füllung, Vivadent Inf. August (1975)

Herrn Professor Dr. W.A.K. Schmidt und Herrn Professor Dr. F. Schübel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die wertvollen Anregungen und die freundliche Betreuung während der Durchführung meiner Untersuchungen und bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. P. Naumann danke ich für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie.

Zu besonderem Dank bin ich Frau M. Klein verpflichtet, die mir bei der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite stand.

LEBENSLAUF

16. Dez. 1939	Hans-Hugo Zemke, als Sohn des Bankangestellten Hans Zemke und seiner Ehefrau Anni, geb. Berghaus, in Düsseldorf geboren.
1946 - 1956	Besuch von Volksschule und Realschule in Wuppertal - Barmen, Mittlere Reife.
1956 - 1959	3 1/2-jährige Lehrzeit als Elektromechaniker, Besuch einer 3-semestrigen Abendschule zur Erlangung der Fachhochschulreife, Facharbeiterprüfung. Giesserei Praktikum.
1960 - 1961	Tätigkeit als Elektromechaniker.
1961 - 1964	Studium der Elektrotechnik an der Staatlichen Ingenierschule für Maschinenwesen in Wuppertal, Staatsexamen: Ing.(grad.) .
seit 1964	Verheiratet mit Apothekerin Christa Zemke, geb. Wolf.
1964 - 1970	Tätigkeit als Entwicklungsingenieur für Niederspannungs Schaltgeräte.
1970	Tätigkeit als Entwicklungsingenieur in den U.S.A.
1970 - 1972	Tätigkeit als beratender Ingenieur.
1972 - 1978	Studium der Zahnmedizin an der Universität Düsseldorf, Staatsexamen, Approbation.
seit 1979	Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde der Westdeutschen Kieferklinik.

Hans-Hugo Zemke